

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 355–361

Die Bestimmung von Progesteron im Harn mit der kompetitiven Proteinbindungsmethode

Von F. Schön, K. Hackenberg, D. Paar und D. Reinwein

Aus der Abteilung für klinische Endokrinologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik
(Direktor: Prof. Dr. D. Reinwein) der Universität Essen (GHS)

(Eingegangen am 2. August 1979/21. Januar 1980)

Herrn Prof. Dr. O. H. Arnold zum 70. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Es wird über eine neue Methode zur Progesteronbestimmung im Harn nach dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindung berichtet. Bei einer Nachweisgrenze für Progesteron von $0,24 \mu\text{g/l}$ Urin liegen die Variationskoeffizienten in der Serie bei 4–10% und von Tag zu Tag bei 9,3–17%. Die Wiederfindung von zugesetztem Progesteron beträgt 104,3%. Bei 8 gesunden Männern liegt die Progesteronausscheidung im Harn bei durchschnittlich $0,12 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$ Kreatinin. Bei 7 gesunden Frauen mit normalem Menstruationszyklus beträgt die Progesteronausscheidung in der Follikelphase $1,4 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$ Kreatinin und in der Lutealphase $7,7 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$ Kreatinin. 175 Sammelurine gesunder Schwangerer zeigen im Verlauf der ungestörten Schwangerschaft einen hochsignifikanten Anstieg ($y = -11,1 + 1,1x$, $r = 0,66$, $p < 0,001$) von 1,5 auf $25,7 \mu\text{g/g}$ Kreatinin.

Determination of progesterone in urine by a competitive protein binding method

Summary: A new method, based on the principle of competitive protein binding, is described for the determination of progesterone in urine. The sensitivity of the assay for progesterone is $0.24 \mu\text{g/l}$ urine. The within-assay precision, as determined by the coefficient of variation, varies between 4 and 10%, the between assay precision between 9.2 and 17%. The recovery of progesterone is 104.3%. The average urinary progesterone excretion in normal men is $0.12 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ creatinine. In the follicular phase of 7 normal women the urinary progesterone excretion is $1.4 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ creatinine, in the luteal phase $7.7 \pm 4.6 \mu\text{g/g}$ creatinine. In normal pregnancy the urinary progesterone excretion rises significantly ($y = -11.1 \pm 1.1x$, $r = 0.66$, $n = 175$, $p < 0.001$) from 1.5 to $25.7 \mu\text{g/g}$ creatinine.

Einführung

Obwohl Ismail & Harkness 1967 (1) und van der Molen & Corpechot 1968 (2) niedrige Progesteronkonzentrationen im Harn Schwangerer nachweisen konnten, wurde unseres Wissens bisher keine Routinemethode zur Progesteronbestimmung im Harn beschrieben. Lediglich Stiefel & Ruse (3) berichteten über eine Doppelisotopen-Methode zur Bestimmung von 16α -Hydroxyprogesteron im Schwangerenharn.

Im folgenden sollen eine Methode zur Bestimmung des Progesterons¹⁾ im Harn mit der kompetitiven Proteinbindungsmethode beschrieben und die Normalwerte für gesunde Männer, Frauen mit ovulatorischen Zyklen und gesunde Schwangere dargestellt werden.

¹⁾ Abkürzungen und Hormone:

CBG = Corticosteroid-bindendes Globulin, Progesteron = 4-Pregnen-3,20-dion, 17α -Hydroxyprogesteron = 17α -Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion, 20α -Dihydroprogesteron = 20α -Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion, Cortisol = $11\beta,17,21$ -Trihydroxy-pregnen-3,20-dion.

Material und Methoden

Reagenzien

[$1,2\text{-}^3\text{H}$]Hydrocortison der Firma New England Nuclear (Lot.-Nr. 853-104), spezifische Aktivität $37 \text{ MBq}/7 \mu\text{g}$ ($1 \text{ mCi}/7 \mu\text{g}$). Zur Herstellung der Stammlösung werden 37 MBq/ml auf 50 ml Benzol/Ethanol ($45 \text{ ml} + 5 \text{ ml}$) gegeben und bei 4°C aufbewahrt. [$4\text{-}^{14}\text{C}$]Progesteron (Code CFA, Batch 38) der Fa. Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire mit einer spezifischen Aktivität von 2246 MBq/mmol entsprechend 7 MBq/mg ($60,7 \text{ mCi/mmol} = 192 \mu\text{Ci/mg}$). Die radiochemische Reinheit beträgt nach Angaben des Herstellers 98%.

Progesteron (Nr. 24614, Fa. Merck). Als Stammlösung lösten wir 10 mg Progesteron in 100 ml Methanol, die im Kühlschrank gelagert wurde. Die Standardlösung setzten wir für jede Bestimmung frisch an, indem wir $10 \mu\text{l}$ der Stammlösung in 100 ml Methanol lösten.

Das Lösungsmittel Petroleumbenzin (p.a., Nr. 1775) mit einem Siedebereich $40\text{--}60^\circ\text{C}$ von der Fa. Merck, Darmstadt, wurde ohne weitere Vorreinigung verwendet.

Als Szintillationsflüssigkeit verwenden wir Unisolve-1 der Fa. Zinsser, Frankfurt. Nach Angaben des Herstellers wird bei Einsatz von 1 ml Wasser und 10 ml Unisolve-1 bei 5°C eine Zähl- ausbeute von 41% für ^3H und von 88% für ^{14}C erzielt.

Aktivkohle Norit A Serva-Labor, Heidelberg.

Dextran T 70 mit einem Molekulargewicht von 70 000 der Fa. Pharmacia, Uppsala.

Kohle-Dextran-Suspension: Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Suspension werden 2 ml 5 g/l Dextranlösung und 2 ml 0,5 g/l Charcoal Norit A-Suspension in 56 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung gelöst. Vor Gebrauch wird die Lösung unter Eiskühlung gemischt.

Geräte

An Geräten werden benötigt: Kolbenhub-Pipetten (Eppendorf), ein Vakuum-Trockenschrank (Fa. Heraeus), einen Schüttelmixer „Whirlimixer“ (Fa. Fisons, Leicestershire), ein Vertikalschüttler (Fa. Degussa, Heidelberg), eine Repetierspritze „Ultra – Asept“ 2 ml der Firma Sartorius, Göttingen, Extraktionsgläser 10 ml mit Schliffstopfen und Reagenzgläser mit rundem Boden (Maße 75 × 11–11,5 mm) der Fa. Scherf, Polyethylen-Zählflaschen der Fa. Zinsser, Frankfurt, mit einem Nulleffekt von 10 Imp./min, Kühlzentrifuge MSE Mistral 6L (Measuring and Scientific Equipment, London) sowie ein Tricarb-Liquid-Szintillationszähler, Packard Typ 2450.

Bindungsserum

Für die Herstellung des Bindungsserums werden einem gesunden Blutspender, der am Vorabend 3 mg Dexamethason erhielt, 500 ml Blut abgenommen und zentrifugiert. Das Serum wird in Portionen zu 5 ml bei – 20 °C eingefroren und erst kurz vor Gebrauch wieder aufgetaut. Im Laufe eines Jahres blieb die CBG-Aktivität bei unseren Versuchen konstant. Vor dem Einsatz des Bindungsserums muß durch Vorversuche die optimale CBG-Verdünnung ausgetestet werden. Die hierbei zu berücksichtigenden Punkte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1. Faktoren, die bei der Austestung des Bindungsplasmas zu berücksichtigen sind (5, 6).

1. Natur und Menge des verwendeten Bindungsproteins
2. Verhältnis der Konzentrationen des Bindungsproteins, Tracers und nachzuweisenden Hormons zueinander
3. Affinitätsverhältnis des markierten und nicht markierten Hormons zum Bindungsprotein.

Eine Verwendung von [^{14}C]Progesteron erwies sich als unbrauchbar, weil beim Einsatz von [^{14}C]Progesteron wegen seiner geringen spezifischen Aktivität (1/1100 der des [^3H]Cortisols) die Bindungskapazität des CBG überschritten wurde. Bei Einsatz von [^3H]Cortisol wurde bei einer CBG-Verdünnung von 1:300 eine genügend große Impulsrate erzielt (etwa 15 500 Imp./min für den Nullwert), so daß der mittlere Zählfehler bei 1 Minute Zählzeit immer unter 2,0% lag. Als beste Bindungsplasma-Zusammensetzung, mit der alle Urinbestimmungen sowie die Qualitätskontrolle erfolgten (siehe Standardkurve Abb. 1) ergab sich:

Verdünnung 1:300
0,045 ml [^3H]Cortisol

Probengewinnung

Die Sammlung der 24-h-Urine wurde in der Regel einen Tag vor dem nächsten Vorstellungstermin durchgeführt. Die Unterweisung in das ordnungsgemäße Urinsammeln erfolgte mündlich während der Beratung. Außerdem wurde eine Sammelanweisung mitgegeben.

Das Volumen der ohne Zusatz gesammelten Urine wurde sofort gemessen und jeweils eine Probe von 50 ml bei – 20 °C eingefroren. Tiefgefroren gelagert soll die Steroidkonzentration nach Murphy (4) unverändert bleiben. Werden die Urinproben bei kühler Raumtemperatur stehen gelassen, so steigt nach 6 Tagen der Progesteron Gehalt auf 110% des ursprünglichen Gehaltes

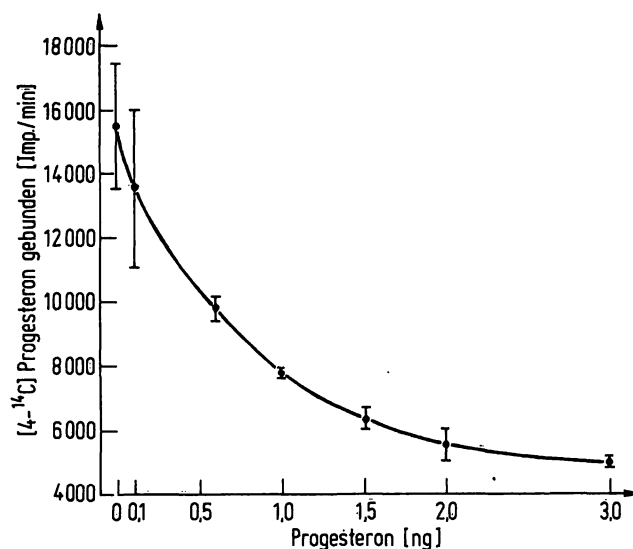


Abb. 1. Typische Progesteron-Standardkurve für den Meßbereich 0–3 ng. Standardabweichung intraassay bei Dreifachbestimmung und 1 Minute Zählzeit. Bindungsplasma-Zusammensetzung: Verdünnung 1:300, 0,045 ml [^3H]Cortisol.

einer frisch untersuchten Probe an, nach 8 Tagen auf 120%, nach 10 Tagen auf 171% (7).

Zur Errechnung der Progesteron-Kreatinin-Ratio wurden simultan in den Harnen die Kreatininkonzentrationen mit der Methode nach *Folin & Wu*, modifiziert für den Autoanalyzer I, Technicon, unter fortlaufender Qualitätssicherung ermittelt.

Statistische Methoden

Für die Angaben des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten wurden die üblichen Formeln verwendet. Die Berechnung des Mittelwertes und des 95%-Vertrauensbereiches logarithmisch verteilter Parameter erfolgte nach den Formeln von *Sachs* (8). An statistischen Tests wurden durchgeführt

1. der t-Test nach *Student* für verbundene Stichproben zur Signifikanzprüfung der Progesteronwerte für die entsprechenden Zeitintervalle,
2. den χ^2 -Test zur Prüfung der Signifikanzen von Häufigkeiten,
3. der U-Test von *Wilcoxon*, *Mann & Whitney* zur Prüfung auf Signifikanz der Differenz der ermittelten Medianwerte bei Gestosen und gesunden Schwangeren.

Zur Berechnung der Stärke des Zusammenhanges zwischen 2 normalverteilten Variablen wurde der Korrelationskoeffizient r ermittelt.

Die Bewertung der diagnostischen Empfindlichkeit und Spezifität erfolgte nach der Ergebnismatrix von *Werner* (9) und den Kriterien nach *Oellerich* (10).

Ergebnisse

Durchführung der Bestimmung

Urinverdünnung

Sammelurine mit einem hohen Progesteron Gehalt (Spätschwangerschaft) erfordern eine Verdünnung mit 9 g/l Natriumchlorid-Lösung, deren Leerwert sich im Assay nicht signifikant von Null unterscheidet (Tab. 2). Dabei ist die möglichst niedrige Verdünnung zu wählen,

Tab. 2. Verdünnungsfaktoren bei einem Extraktionsverhältnis von 1 + 4.

Progesterongehalt (µg/l)	Verdünnung	Verdünnungsfaktor für 0,5 ml/1 ml Volumeneinsatz
< 18	unverdünnt	8/ 4
< 36	1: 2	16/ 8
< 72	1: 4	32/16
< 90	1: 5	40/20
< 180	1:10	80/40

da mit steigender Verdünnung die gemessene Progesteronkonzentration überproportional fällt.

Extraktion

1 ml Urin oder eine entsprechende Verdünnung wird in ein Schliffstopfenröhrchen pipettiert und nach Zugabe von 1 ml Petroläther fest verschlossen (Abb. 2). Mit einem Vertikalschüttler werden die beiden Phasen 5 Minuten lang durchmischt. Anschließend werden von der oberen organischen Phase 0,5 ml und 1,0 ml mit einer 500 µl Kolbenhub-Pipette pipettiert und bei 30 °C im Vakuum-Trockenschrank getrocknet. Eine zweimalige Extraktion mit Petroläther oder einmalige mit 8 ml Petroläther ändert die Meßwerte nicht.

Standardkurve (Abb. 1)

Nach Herstellen einer frischen Progesteron-Standardlösung und Spülen der Röhrchen mit Methanol werden entsprechende Volumina der Standardlösung für Standardpunkte (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 ng Progesteron) mit einer Kolbenhub-Pipette in die Röhrchen pipettiert und ebenfalls bei 30 °C im Vakuum-Trockner getrocknet. Die Temperatur von 30 °C sollte dabei eingehalten werden. Ebenso sollten die Proben der Standardkurve separat von den Urinproben getrocknet werden.

Proteinbindung

Nach Trocknen der Urin- und der Standardproben gibt man auf alle Trockenextrakte 1,0 ml des Bindungs-

plasmas und mischt jeweils 5 Sekunden auf dem Vortexmischer. Die Inkubation erfolgt zunächst 5 Minuten im Wasserbad von 40 °C und danach für 20 Minuten im Eisbad. Eine Inkubationszeit von 5 Minuten im Wasserbad bei 40 °C reicht aus, um das getrocknete Progesteron im Bindungsplasma zu lösen und die Gleichgewichtseinstellung zu beschleunigen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führt zum Abflachen der Standardkurve (7, 11).

Trennung des gebundenen vom freien Traceranteil

Anschließend an die Inkubation setzen wir 0,5 ml der Kohle-Dextran-Suspension mit der Ultra-Aseptspritze zu. Dieser Pipettiervorgang dauert weniger als 1 Minute. Nach genau 10 Minuten Kontaktzeit mit der Kohle-Dextran-Suspension werden die Proben bei 2000 g 3 Minuten lang in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die praktizierte Adsorptionstechnik mit der Kohle-Dextran-Suspension ist keine Gleichgewichtsreaktion. Um die Menge an freiem Tracer, der trotz Zentrifugation im Assay bleibt, und der Menge, die vom CBG dissoziiert, konstant zu halten, haben wir in allen Versuchen 3 Minuten Zentrifugation und 10 Minuten Kontaktzeit genau eingehalten.

Zählen im Tricarb

Nach Beendigung der Zentrifugation in der Kühlzentrifuge werden die Proben wieder ins Eiswasser gestellt, und aus jedem Röhrchen 1 ml des Überstandes in ein Zählfläschchen gegeben. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit zählt man die Proben 1 Minute im Tricarb.

Meßzeit von 1 Minute führt zu einem mittleren Zählfehler von weniger als 1%. Längere Meßzeiten sind nur praktikabel, wenn über Nacht gezählt werden kann, dann aber vorzuziehen (Zählfehler bei einer Meßzeit von 2 min: 0,8%, 4 min: 0,6%, 10 min: 0,2%). Die 24-h-Ausscheidung bezogen auf 1 g Kreatinin (Progesteron-Kreatinin-„Ratio“) beträgt:

$$\frac{\text{Progesteron } (\mu\text{g/l}) \cdot 1000}{\text{Kreatinin mg/l}} = \frac{\mu\text{g Progesteron}}{\text{g Kreatinin}}$$

Neben der manuellen Auswertung kann die Standardkurve auch mittels Spline-Approximation von einem Tischrechner (DIEHL-alphatronic Tischrechner, Programm BF-DAL) aufgestellt werden.

Zuverlässigkeit der Methode

Spezifität

Die Bestimmung der Spezifität im Vergleich zu anderen Methoden konnte wegen fehlender chromatographischer Referenzmethode nicht durchgeführt werden. Allgemein kann die Spezifität nur von solchen Substanzen beeinflusst werden, die durch die Petroläther-Extraktion erfaßt

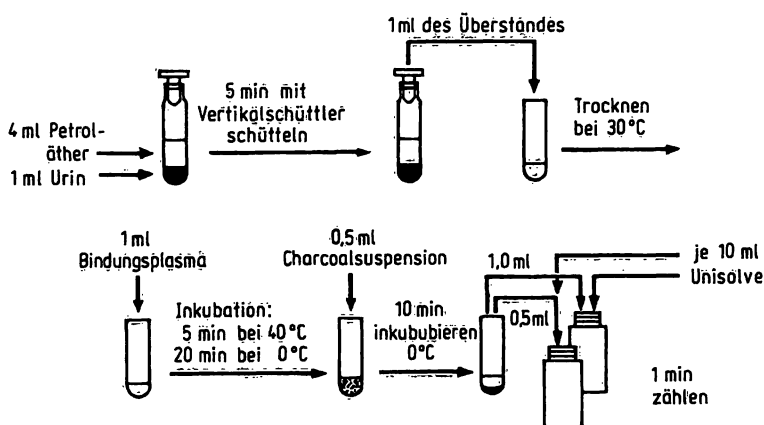


Abb 2 Schema des Arbeitsgangs der Progesteronbestimmung im Harn mit der kompetitiven Proteinbindungsmethode.

und vom CBG gebunden werden. Durch Petroläther wird das im Serum vorhandene Progesteron zu 85,5 bis 97,5% erfaßt (Tab. 3). in unserem Assay betrug die Wiederfindung von radioaktiv markiertem Progesteron im Petroläther 98,5% (7, 11). Cortisol, Corticosteron und 11-Desoxycortisol beeinflussen die Methode nicht (12, 13). Die Wiederfindung von [^3H]Cortisol betrug in unserem Assay 1,6% (n = 8). Das Hauptabbauprodukt des Progesterons, das Pregnandiol, liegt im Harn überwiegend in glucuronidierter Form vor (14) und wird mit der Petroläther-Extraktion nicht erfaßt (15).

Tab. 3. Steroide, die mit der Petroläther-Extraktion erfaßt werden.

Steroid	Neill (31)	Murphy (17)*	Johansson (12)*	Reeves (29)
Progesteron	90%	97,3%	85,5%	86,5%
20 α -Dihydroprogesteron	90%		64%	77,5%
17 α -Hydroxyprogesteron	40%		14%	28,1%
Testosteron		84%	28,5%	
Corticosteron	1%	16%	< 0,25%	
Cortisol	1%	8,8%	< 0,25%	
11-Desoxycortisol			< 0,25%	

* Wiederfindung mit radioaktiv markierten Steroiden.

Wegen ihrer geringen Bindungsaffinität zum CBG ist die Interferenz von 20 α -Dihydroprogesteron (16) und 17 α -Hydroxyprogesteron (17) zu vernachlässigen. Ebenso spielt Testosteron bei der Konkurrenz um die Bindungsstellen am CBG keine Rolle, da es trotz eines 5–10fachen Anstiegs im Serum Schwangerer (18) nur eine relative Bindungsaffinität zum CBG von 4%, verglichen mit Cortisol, aufweist (17, 18).

Richtigkeit

Die Richtigkeit ergibt sich aus der Wiederfindung von Progesteron in einem Urin mit einem Progesterongehalt von 1,76 $\mu\text{g/l}$ Urin. Sie beträgt bei n = 16 im Durchschnitt 104,3% (Tab. 4).

Tab. 4. Wiederfindung von Progesteron.

Zusatz von Progesteron (ng)	Progesteron gemessen (ng)	n	Wiederfindung
ohne	1,76	5	–
0,5	2,40	6	0,64:0,50 = 128%
1,0	2,69	6	0,97:1,00 = 97%
2,0	3,60	4	1,84:2,00 = 92%

Präzision

Aufgrund der Intraassay-Streuung der Werte der Standardkurve beträgt die Präzision zwischen 4 und 10% für den Bereich der Kurve, in dem abgelesen wird.

Die Intraassay-Präzision der Urinbestimmungen liegt zwischen 2,1 und 6% (Tab. 5). Bei der Streuung von Tag zu Tag (interassay) liegt der Variationskoeffizient für den Meßbereich der Kurve im Durchschnitt bei 12,9% (Bereich von 9,3–18%) und für die Kontrollurine (Tab. 6) bei 5,7% (Bereich 3,3–8,0%).

Tab. 5. Intraassay – Präzision.

Progesteron (ng)	s (ng)	VK (%)
Standardkurve (3-fach Bestimmung)		
0,1	0,04	40
0,5	0,035	6,9
1,0	0,1	10
1,5	0,06	4
2,0	0,16	8
3,0	0,23	7,7
Urin (5-fach Bestimmung)		
1,63	0,097	6,0
14,42	0,31	2,1

Tab. 6. Interassay – Präzision

Progesteron (ng)	s (ng)	VK (%)
Standardkurve (3-fach Bestimmung)		
0,1	0,039	39
0,5	0,09	18
1,0	0,17	17
1,5	0,14	9,3
2,0	0,21	10,5
3,0	0,30	10
Kontrollurine		
5,3	0,29	5,5
10,0	0,6	6,0
14,1	1,13	8,0
5,98	0,2	3,3

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ergibt sich aus dem Null-Nanogramm-Wert plus 3 s. Sie beträgt 0,24 $\mu\text{g/l}$ Progesteron.

Praktikabilität

Im Rahmen unserer Versuchsreihe führten wir etwa 900 Progesteronbestimmungen im Harn durch. Dabei erwies sich die Methode als praktikabel und kostengünstig. Der Umfang einer Analysenserie wird durch die Trocknergröße und die Kühlzentrifugeneinsätze beschränkt. Für die Bestimmung von 19 Urinen als Doppelbestimmungen einschließlich Kontrollurin und Standardkurve als 3-fach-Bestimmung benötigen wir ohne Zählen im Tricarb etwa 5–6 Stunden. Die Materialkosten für eine Bestimmung betragen im Mittel 1,50 bis 2,00 DM.

Referenzwerte

Bei gesunden Männern ($n = 8$) liegt die Progesteronausscheidung bei $0,12 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$ Kreatinin (siehe Abb. 3). Bei Frauen mit normalem Menstruationszyklus ist die Ausscheidung des Progesterons in der Lutealphase mit $7,7 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$ Kreatinin signifikant höher als in der Follikelphase mit $1,4 \pm 1,1$ ($n = 7$, $p < 0,005$). Die 7 untersuchten Probandinnen zeigten eine deutliche Erhöhung der Progesteronausscheidung im 24-h-Urin vom 8.–10. zum 18.–22. Zyklustag (Abb. 3).

Die Progesteronausscheidung im Harn bei 175 gesunden Schwangeren zeigt eine logarithmische Normalverteilung (7). Die Progesteron-Kreatinin-Ratio steigt im Verlauf der ungestörten Schwangerschaft hochsignifikant an ($p < 0,001$, $y = -11,1 + 1,1x$, $r = 0,66$, $n = 175$). Mittelwerte und 95%-Vertrauensbereich siehe Abbildung 4 und Tabelle 7.

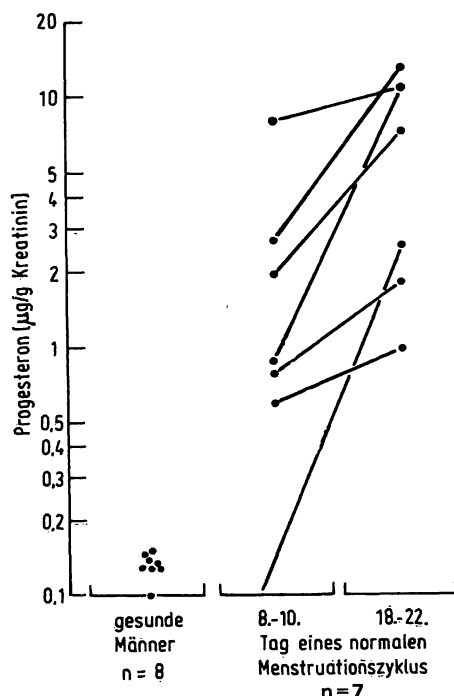


Abb. 3. Normalwerte der Progesteronausscheidung gesunder Männer ($n = 8$) und Frauen ($n = 7$) im Harn in $\mu\text{g/g}$ Kreatinin.

Methodenkritik

Um den Anforderungen an Präzision, Richtigkeit und Empfindlichkeit (10, 21) zu genügen, müssen folgende kritische Schritte der Methode beachtet werden:

1. Herstellung eines geeigneten Bindungsserums
2. Standardisierter Extraktionsmodus
3. Einhaltung der Inkubationsbedingungen

Bei Verwendung von humanem CBG muß durch eine große Plasmaverdünnung die Bindungskapazität anderer Bindungsproteine wie Albumin und Orosomucoid redu-

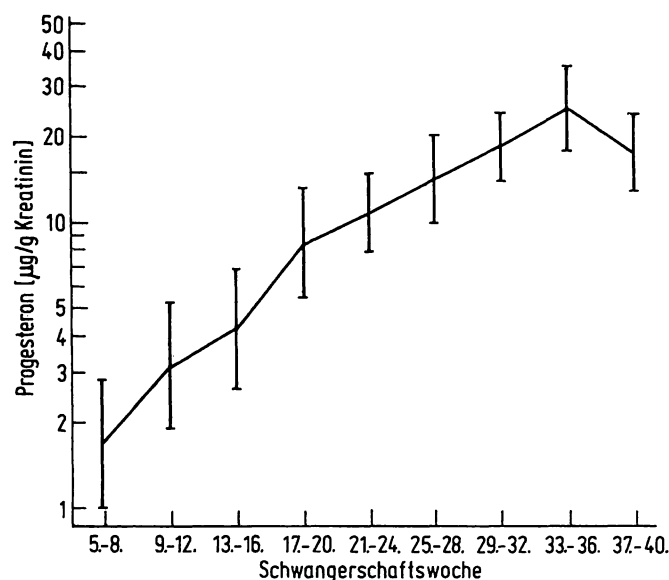


Abb. 4. Ausscheidung von Progesteron im Harn in $\mu\text{g/g}$ Kreatinin im Verlauf der normalen Schwangerschaft ($n = 175$). Die Balken geben den 95%-Vertrauensbereich wieder.

Tab. 7. Mittelwerte und 95%-Vertrauensbereich der Progesteronausscheidung in $\mu\text{g/g}$ Kreatinin bei 175 Schwangeren.

Schwangerschaftswoche	n	95%-Vertrauensbereich	\bar{x}	
5.-8.	8	0 - 2,8	1,5	$p < 0,001$
9.-12.	17	1,9 - 5,2	3,1	
13.-16.	17	2,6 - 6,9	4,3	
17.-20.	17	5,4 - 13,4	8,5	
21.-24.	21	7,9 - 14,8	10,8	
25.-28.	33	10,1 - 20,3	14,4	$p < 0,001$
29.-32.	20	14,0 - 24,7	18,6	
33.-36.	20	18,3 - 36,0	25,7	
37.-40.	22	13,0 - 24,4	17,8	
1. Trimenon	30	0 - 6,9	2,6	$p < 0,001$
2. Trimenon	77	3,9 - 27,7	10,4	
3. Trimenon	68	9,0 - 38,8	18,7	$p < 0,001$
gesamte Schwangerschaft	175	3,4 - 31,5	10,3	

ziert werden (12, 15, 22, 23). Nach Austestung mehrerer Verdünnungen wählten wir für die Messung im 0 bis 3 ng-Bereich eine 1:300-Verdünnung, die noch einen Impulsabfall von mehr als 50% lieferte. Ein geeignetes Bindungsplasma für den Meßbereich 0–30 pg konnte nicht gefunden werden. Dies scheint bei Verwendung von Hühnerplasma (17) oder Pferde-CBG (24), die eine weitaus höhere Progesteronaffinität aufweisen, eher möglich zu sein.

Die Menge an radioaktiv markiertem Cortisol, die dem Bindungsplasma zugegeben werden soll, hängt von der zu messenden Hormonkonzentration und von der aus meßtechnischen Gründen erforderlichen Zahl der Impulse pro Minute ab. [^{14}C]Progesteron erwies sich wegen der zu geringen spez. Aktivität als nicht verwendbar.

Die Extraktion des Progesterons aus dem Urin wurde mit Petroläther im Verhältnis 4 + 1 (Petroläther + Urin) für genau 5 Minuten durchgeführt. Zwar wurde bisher in der Literatur ein Verhältnis von 10:1 empfohlen (12, 17), doch reicht der hier beschriebene Modus aus, um 98,5% von [^{14}C]Progesteron zu erfassen (7, 11). Eine mehrfache Petroläther-Extraktion erweist sich als nicht erforderlich (25).

Da das CBG im Gegensatz zu Albumin bei der Reaktion mit Steroiden temperaturabhängig ist (26), müssen die Inkubationstemperaturen und -zeiten genau eingehalten werden. Eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei 40 °C erweist sich als ausreichend, ebenso eine Inkubation von 20 Minuten (27) bei 0 °C. Nach Westphal (28) ist bei niedrigen Temperaturen die Bindungsaffinität des CBG gegenüber Progesteron am größten. Nach unseren Erfahrungen reichen Inkubationszeiten unter 15–17 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung nicht aus.

Wird Charcoal als Adsorbens verwendet, ist zu berücksichtigen, daß

1. die Spezifität der Methode beeinflusst wird,
2. zunehmende Charcoalmengen die Standardkurve senken (17) und
3. bei Verlängerung der Adsorptionszeit die Standardkurve abflacht.

Wird die Kontaktzeit mit der Kohle-Dextran-Suspension über 10 Minuten ausgedehnt, werden falsch hohe Progesteronkonzentrationen im Harn gemessen.

Für die Spezifität der Progesteronmethode müssen keine Einschränkungen gemacht werden. Neben Progesteron können nur Testosteron, 20 α -Dihydroprogesteron und 17 α -Hydroxyprogesteron interferieren (Tab. 3) (5, 12, 17, 29). Testosteron wird in so geringen Mengen im Harn Schwangerer ausgeschieden (18), daß seine Interferenz im Streubereich der Methode liegt. Über die renale Ausscheidung von 20 α -Dihydro- und 17 α -Hydroxyprogesteron liegen keine Angaben vor. Wird 17 α -Hydroxyprogesteron in freier Form ausgeschieden, dürfte es nur im 1. Trimester interferieren, da es nach einem Inkretionsmaximum in der 3. Schwangerschaftswoche nach

der 16. Schwangerschaftswoche nur noch in Konzentrationen von 20 $\mu\text{g/l}$ im Blut vorkommt. Inwieweit 16 α -Hydroxyprogesteron und Pregnenolon, die gegen Ende der Schwangerschaft vermehrt renal ausgeschieden werden, im Assay interferieren, muß vorerst offen bleiben.

Bei Reduktion von Sammel Fehlern des 24-h-Urins durch Angabe der Progesteron-Kreatinin-Ratio (20) und Vermeidung der erwähnten Störfaktoren der Analyse (7) erweist sich die Bestimmung des Progesterons im Harn als eine empfehlenswerte Methode, die die Beurteilungskriterien einer zuverlässigen analytischen Methode (21, 30) erfüllt. Den Nachteilen einer relativ langen Analysendauer und der Austestung des Bindungsplasmas stehen die Vorteile der Spezifität und geringen Kosten gegenüber.

Klinische Anwendung

Nach ersten klinischen Erfahrungen (7, 11, 19) kann die Bestimmung der Progesteronausscheidung im Harn zum Nachweis der Ovulation und zur Schwangerschaftsüberwachung eingesetzt werden.

Die 7 untersuchten Patientinnen mit ovulatorischen Menstruationszyklen zeigten nach der Ovulation eine hochsignifikant höhere Progesteronausscheidung als vor dem Ovulationszeitpunkt, so daß eine entsprechende Erhöhung der Progesteronausscheidung im Harn als Hinweis auf eine Ovulation gewertet werden kann. Die Sammelperiode (24 Stunden bzw. 8 Stunden) hat keinen Einfluß auf die ermittelten Progesteronwerte, sofern die Ausscheidung als Progesteron-Kreatinin-Ratio auf Kreatinin bezogen wird (20).

Zum anderen kann die Progesteronbestimmung im Harn als Kenngröße des placentaren Funktionszustandes zur Schwangerschaftsüberwachung eingesetzt werden (19). Erniedrigte Progesteronwerte im Harn gehen signifikant ($p < 0,05$, $n = 38$, χ^2) mit erniedrigten Konzentrationen von Human-Placenta-Lactogen im mütterlichen Blut einher. Bei Patientinnen mit Ödem-Proteinuria-Hypertension-Gestosen liefert die Progesteronbestimmung im Harn in 65% richtig-positive Ergebnisse.

Literatur

1. Ismail, J. & Harkness, R. A. (1967), Acta Endocrinol. (Kbh.) 56, 272.
2. Molen, H. J. van der & Corpechot, C. (1968), J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1361–1366.
3. Stiefel, M. & Ruse, J. L. (1969), J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 7–11.
4. Murphy, B. E. P. (1970), Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 147, 37.
5. Ekins, R. P. & Newman, B. (1970), Acta Endocrinol. (Kbh.), Suppl. 147, 11–24.
6. Rodbard, D., Bridson, W. & Rayford, P. L. (1969), J. Lab. Clin. Med. 74, 770.
7. Schön, F. (1977), Das freie Cortisol und Progesteron im Harn während der Schwangerschaft. Methodische Untersuchung zur kompetitiven Proteinbindungsmethode, Inaugural-Dissertation, Essen.
8. Sachs, L. (1975), Statistische Methoden, Springer Verlag Berlin, 4. Auflage.
9. Werner, M. (1977), Med. Welt 29, 1254–1257.
10. Oellerich, M. & Haeckel, R. (1978), Med. Welt 21, 866–872.

11. Bülle, J. R. (1978), Bestimmung der freien Harn corticoide und des freien Progesterons im Harn mittels kompetitiver Proteinbindungsmethode und radioimmunologische HPL-Bestimmung im Plasma bei Schwangeren mit EPH-Gestose, Inaugural-Dissertation Essen.
12. Johansson, E. D. B. (1969), *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 61, 592–606.
13. Breuer, H., Hamel, D. & Kruskemper, H. L. (1975), *Methoden der Hormonbestimmungen*, Thieme Verlag Stuttgart.
14. Wyss, H. J. (1970), Östrial- und Pregndioliasscheidung in der zweiten Schwangerschaftshälfte, Huber Verlag Bern.
15. Johansson, E. D. B. (1969), *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 61, 607–617.
16. Sommerville, I. F. & Vetrano, G. (1975), in: *Methods in investigation and diagnostic endocrinology* (Berson, S. A., ed.) Vol. 3, 73–124, Amsterdam.
17. Murphy, B. E. P. (1967), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 973–978.
18. Demisch, K., Grant, J. K. & Black, W. (1968), *J. Endocrinol.* 42, 447.
19. Schön, F., Hackenberg, K. & Fischer, W. M. (1980), in *Vorber.*
20. Dickey, R. P., Besch, P. K., Vorys, N. & Ullery, J. C. (1968), *Am. J. Obst. Gynecol.* 4, 591–594.
21. Reeves, B. D. & Calhoun, D. W. (1970), *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, Suppl. 147, 6–10.
22. Köbberling, J. & Mühlen, A. v. z. (1972), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 10, 495–501.
23. Vermeulen, A. (1975), Bestimmung von Cortisol im Plasma durch die kompetitive Proteinbindung, in: *Methoden der Hormonbestimmungen* (Breuer, H., Hamel, D. & Kruskemper, H. L., ed.) Thieme Verlag Stuttgart, 169.
24. Murphy, B. E. P. (1975), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 1050.
25. Johansson, E. D. B. (1970), *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, Suppl. 147, 188–203.
26. Burton, R. M. & Westphal, U. (1972), *Metabolism* 21, 253.
27. Murphy, B. E. P. (1969), *Recent Progr. Hormone Res.* 25, 563–566.
28. Westphal, U. (1966), *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.* 346, 234.
29. Reeves, B. D., Souza, M. L. A. de, Thomson, I. E. & Diczfalussy, E. (1970), *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 63, 225–241.
30. Wissner, H. (1977), *Med. Welt* 28, 1251–1254.
31. Neill, J. D., Johansson, E. D. B., Datta, J. K. & Knobil, E. (1967), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 1167.

Dr. med. F. Schön
Prof. Dr. med. K. Hackenberg
Priv.-Doz. Dr. med. D. Paar
Prof. Dr. D. Reinwein
Abteilung für klinische Endokrinologie der
Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Universität Essen (GHS)
Hufelandstr. 55
4300 Essen

